

10/532579

PCT/JP03/14009

#2

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

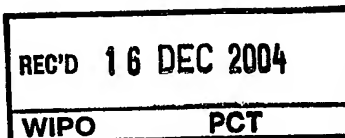
03.10.2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 0 月 3 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 1 8 0 5 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 1 8 0 5 2]



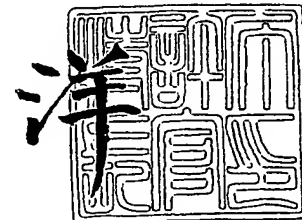
出 願 人 独立行政法人理化学研究所
Applicant(s): 丹羽 仁史

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号

出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 0 1 9 8

【書類名】 特許願
【整理番号】 185124
【提出日】 平成14年10月31日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
C12N 5/06
C12N 5/08

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県高市郡明日香村細川 6 8 9

【氏名】 丹羽 仁史

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区雲井通 3 - 1 - 6

【氏名】 小川 和也

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【住所又は居所】 奈良県高市郡明日香村細川 6 8 9

【氏名又は名称】 丹羽 仁史

【特許出願人】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区雲井通 3 - 1 - 6

【氏名又は名称】 小川 和也

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100086405

【弁理士】

【氏名又は名称】 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100064610

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 正二

【選任した代理人】

【識別番号】 100067035

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩崎 光隆

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 多能性幹細胞培養用の培地補充物とその使用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の少なくとも 1 種を含有する、多能性幹細胞培養用の培地補充物。

【請求項 2】 アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質が、SQ22536（9-（テトラヒドロ-2-フラニル）-アデニン）、2',5'-ジデオキシアデノシン、9-シクロペンチルアデニン、2',5'-ジデオキシアデノシン 3'-ジホスフェート、2',5'-ジデオキシアデノシン 3'-モノホスフェート及びMDL-12,330A（シス-N-（2-フェニルシクロペンチル）アザシクロトリデセ-1-エン-2-アミン）からなる群から選択される、請求項 1 に記載の培地補充物。

【請求項 3】 アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質が、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）及び下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド（PACAP）並びにそれらと実質的に同様の生理活性を有するペプチドから選択される、請求項 1 に記載の培地補充物。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれかに記載の培地補充物を含む、多能性幹細胞培養用の培地。

【請求項 5】 支持細胞及び／又は血清を含まない、請求項 4 に記載の培地。

【請求項 6】 支持細胞及び血清を含まない、請求項 4 に記載の培地。

【請求項 7】 細胞培養用最小培地を基礎培地とする、請求項 4～6 のいずれかに記載の培地。

【請求項 8】 さらに分化抑制因子、血清置換物及び抗酸化剤を含む、請求項 4～7 のいずれかに記載の培地。

【請求項 9】 多能性幹細胞を培養して未分化多能性幹細胞を増殖させるにあたり、当該培養をアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下で行うことを特徴とする、多能性幹細胞の培養方法。

【請求項 10】 アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件がアデニル酸シ

クラーゼ活性抑制物質の使用を伴うものである、請求項 9 記載の培養方法。

【請求項 1 1】 培養を請求項 4 ～ 8 のいずれかに記載の培地で行う、請求項 9 記載の培養方法。

【請求項 1 2】 1 個の多能性幹細胞を培養してそのクローン細胞集団を得る、請求項 9 ～ 1 1 のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 1 3】 支持細胞及び／又は血清が存在せず、かつ、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の培地補充物が存在しない条件下では未分化増殖を起こさない多能性幹細胞を、請求項 5 又は 6 に記載の培地で培養してそのクローン集団を得る、請求項 9 ～ 1 2 のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 1 4】 1 個の多能性幹細胞を請求項 5 又は 6 に記載の培地で培養してそのクローン集団を得る、請求項 9 ～ 1 2 のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 1 5】 多能性幹細胞が E S 細胞である、請求項 9 ～ 1 4 のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 1 6】 多能性幹細胞が哺乳類由来のものである、請求項 9 ～ 1 5 のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 1 7】 多能性幹細胞がヒト由来のものである、請求項 9 ～ 1 5 のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 1 8】 請求項 9 ～ 1 7 のいずれかに記載の培養方法で増殖させた、多能性を保持する未分化多能性幹細胞。

【請求項 1 9】 多能性幹細胞を培養して未分化多能性幹細胞を樹立させるにあたり、当該培養をアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下で行うことを特徴とする、多能性幹細胞の培養方法。

【請求項 2 0】 アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件がアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の使用を伴うものである、請求項 1 9 記載の培養方法。

【請求項 2 1】 培養を請求項 4 ～ 8 のいずれかに記載の培地で行う、請求項 1 9 記載の培養方法。

【請求項 2 2】 多能性幹細胞が E S 細胞である、請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 2 3】 多能性幹細胞が哺乳類由来のものである、請求項 1 9 ～ 2

2のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 24】 多能性幹細胞がヒト由来のものである、請求項 19～22のいずれかに記載の培養方法。

【請求項 25】 請求項 19～23のいずれかに記載の培養方法で樹立させた、多能性を保持する未分化多能性幹細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、多能性幹細胞培養用の培地補充物とその使用、特に支持細胞や血清が存在しない培地における多能性幹細胞の培養を可能にする培地補充物及びこれを含有する培地並びにそれらの使用に関する。

【0002】

【従来の技術】

多能性幹細胞は、少なくともそれぞれ1種類ずつの外胚葉、中胚葉、内胚葉に属する分化細胞に分化する能力を有する自己複製可能な幹細胞であり、胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES細胞)、胚性生殖細胞 (embryonic germ cell: EG細胞)、胚性癌細胞 (embryonal carcinoma cell: EC細胞)、多能性成体前駆細胞 (multipotent adult progenitor cells: MAP細胞)、成体多能性幹細胞 (adult pluripotent stem cell: APS細胞) などを包含する。以下、これらのうちES細胞を例に挙げて、本発明を詳細に説明する。

【0003】

ES細胞は、初期胚に存在する多能性幹細胞集団に由来する細胞株であって、生殖細胞を含む種々の細胞に分化する能力を有しており、特定の培養条件下で多能性を維持したまま増殖させることができる。このような条件下で培養されたES細胞を胚盤胞または桑実胚に注入すると、キメラ動物 (2種の異なるゲノムを有する動物) が生成される。遺伝子操作されたES細胞に由来する生殖細胞を有するキメラ動物を交配することにより、操作された遺伝子を持つ動物個体を作成することができる。このため、ES細胞は、ノックアウトマウス (特定遺伝子の機能が改変されたマウス) を含むトランスジェニック動物の作成に広く用いられ

ている。また、シャーレ内でES細胞を分化誘導して特定の分化細胞を得る技術も開発されている。この技術をヒトES細胞に適用することにより、細胞移植治療に必要な分化細胞が得られることから、将来的には医療の分野におけるES細胞の利用も期待されている。

【0004】

以上のように、ES細胞を分化させることなく、多能性（分化能）を保持したまま増殖または樹立させる培養技術は、既に開発されている。すなわち、ES細胞を培養する培地には、通常、血清（例えば、ウシ胎児血清（fetal calf serum: FCS）、ウマ血清、ヤギ血清）を添加する。血清はES細胞の分化を抑制し、増殖または樹立を促進する種々の液性因子を供給するものであるが、これらの因子は現在まで同定されていない。また、血清はロット間の変動が大きいので、多大な労力を要する予備スクリーニングによって、適切なものを選別する必要がある。

【0005】

また、ES細胞は、通常、不活性化して増殖を停止させた胎児性初代培養線維芽細胞やSTO細胞などを支持細胞として使用し、その上に重層培養されている。この際、支持細胞は、ES細胞付着のためのマトリックスを提供すると共に、ES細胞の分化を抑制し、増殖を促進する種々の液性因子を放出すると考えられている。

【0006】

そのような液性因子の1つとして白血病阻害因子（leukemia inhibitory factor: LIF）が知られており（米国特許第5,187,077号）、これは様々な動物に由来するES細胞の分化抑制能を有するところから、多くの場合、血清、支持細胞、LIFを組合せて使用している。また、血清含有培地に大量の組換えLIFタンパク質を添加することにより、支持細胞非依存性のES細胞をゼラチンコートプレート上で培養することも可能とされている（米国特許第5,166,065号）。

【0007】

上記したような血清や支持細胞の使用は、ヒトES細胞に由来する分化細胞を

細胞移植治療に応用しようとする際、大きな問題を生じる。すなわち、ヒトES細胞の培養は、通常、ウシ胎児血清を含む培地を使用して、不活性化したマウス胎児性初代培養線維芽細胞を支持細胞として行なわれてきたが、これら異種動物由来の生体成分は、常に未知病原体の感染源となりうる。また、米国食品医薬局の草案では、異種細胞と共培養されたヒト細胞の移植は異種移植 (xenotransplantation) と見なされ、被移植者の生活制限がなされることになる。

【0008】

従って、ES細胞のような多能性幹細胞の細胞生物学的特性の解析やその医学的応用において、その単離、培養は、異種動物由来の感染源や異種細胞を含むことのない培地、すなわち支持細胞や血清を含まず、人為的調製が可能な既知成分のみからなる培地を使用して行うことが望ましいことは明らかである。

【0009】

このような要望に答えるべく、種々の研究が行われ、提案がなされてきた。その代表例として、血清を含む培地に大量の組換えLIFタンパク質を添加することにより、支持細胞非依存性のES細胞をゼラチンコートプレートの上で培養する方法がある（米国特許第5, 166, 065号）。また、血清に代えて特定の置換物を含む胚性幹細胞培養用培地（特開2001-508302号公報）が提案され、支持細胞の存在下で、血清を含まない培地による培養を可能にしている。しかしながら、大量の組換えLIFタンパク質を培地に供給しても、血清の代わりに特定の置換物を含む既知成分のみからなる培地で支持細胞非依存性のES細胞をゼラチンコートプレート上で安定に培養することは不可能であった。特に、ES細胞の樹立や遺伝子操作のためには、低密度播種条件下に単一のES細胞を増殖させる必要があるが、上記の条件ではそのような増殖を行うことが不可能であった。

【0010】

【特許文献1】

特開2001-508302号公報

【特許文献2】

米国特許第5, 166, 065号明細書

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

上記したように、支持細胞や血清を使用しない、人為的に調製可能な既知成分のみからなる培地で、ES細胞のような多能性幹細胞を培養することは、これまで不可能であった。本発明の技術的課題は、このように従来、不可能とされてきた、支持細胞や血清を使用しない、人為的に調製できる既知成分のみからなる培地による、多能性幹細胞の培養を可能にすることにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題を解決すべく種々研究を重ねた結果、多能性幹細胞を培養して未分化多能性幹細胞を増殖または樹立させるにあたり、当該培養をアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下で行なうことにより、上記課題が解決できる事実を見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0013】

「アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件」を作成する最も典型的な具体例は、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を多能性幹細胞の培養培地に添加または配合することである。これにより当該培地に支持細胞や血清が存在しなくとも、多能性幹細胞を分化させることなく、その分化能を保持したまま、増殖または樹立することが可能となる。

【0014】

【発明の実施の形態】

従って、本発明の主たる目的は、少なくとも1種のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を含有する、多能性幹細胞培養用の培地補充物を提供するにある。他の目的は、そのような培地補充物を含む、多能性幹細胞培養用の培地を提供するにある。さらに他の目的は、そのような培地を使用する、多能性幹細胞の培養方法を提供するにある。さらにまた他の目的は、上記したような培地で培養し、増殖または樹立された未分化多能性幹細胞を提供するにある。これらおよびその他の目的は、当業者にとって、以下に記載する本発明の詳細な説明から明らかとなるう。

【0015】

本明細書において、「多能性」とは、外胚葉、中胚葉、内胚葉に属する少なくともそれぞれ1種類ずつの分化細胞に分化する能力を意味し、生殖細胞への分化能も、この概念に包含される。

【0016】

「多能性幹細胞」とは、外胚葉、中胚葉、内胚葉に属する少なくともそれぞれ1種類ずつの分化細胞に分化する能力（多分化能）を有する自己複製可能な幹細胞を意味し、ES細胞、EG細胞、EC細胞、MAP細胞、APS細胞などが含まれる。その代表例である「胚性幹細胞（ES細胞）」は、多分化能を有し、他の胚盤胞中に注入されると、生殖細胞をも含む種々の細胞に分化し得る細胞である。

【0017】

「支持細胞」とは、それ自体は増殖できないが、代謝活性を有しており、種々の代謝物質を産生することにより、その上に植えられた他の細胞の増殖を助ける細胞をいう（村松正実ら：「分子細胞生物学辞典」367頁（1997年）（株）東京化学同人発行参照）。例えば、ES細胞の場合、不活性化して増殖を停止させた胎児性初代培養繊維芽細胞又はSTO細胞を支持細胞として使用する。

【0018】

「支持細胞非依存性多能性幹細胞」とは、血清の存在下、支持細胞を含まない培養条件で増殖し得る多能性幹細胞を意味する。多能性幹細胞は、本来、そのような培養条件では、未分化増殖培養することが困難なものであるが、継代培養を続けることにより、支持細胞非依存性を取得するようになる。但し、従来の技術では、血清の代わりに血清置換物を使用して培養すると、支持細胞非依存性多能性幹細胞であっても、支持細胞非存在下の低密度播種条件で増殖または樹立させることは不可能であった。

【0019】

本発明によって提供される多能性幹細胞培養用の培地補充物は、少なくとも1種のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を含有することを特徴とする。アデニル酸シクラーゼは、ATPからcAMP（サイクリックAMP）を生成させる酵素

であり、細胞のシグナル伝達における中心的な酵素である。この酵素の活性は、主にGタンパク質共役型受容体を介してさまざまな細胞外シグナルにより調節され、生じるcAMPは細胞内第2メッセンジャーとして働く。哺乳動物では、現在までにヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ウサギなどで、計10種類のアデニル酸シクラーゼの存在が報告されている（例えば、Patel, TB et al., Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function, Gene, 269, 13-25, 2001）。ヒトではこのうち9種類について、マウスでは5種類について遺伝子が単離されているが、マウスで単離されたものは全てヒトでもよく配列が保存されていること、およびこれらの分子が細胞増殖制御などの基本的な生命現象に不可欠であることから、多能性幹細胞におけるアデニル酸シクラーゼの機能もこれらの動物種で共有していると考えられる。

【0020】

本発明の多能性幹細胞培養用の培地補充物として使用するアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質は、細胞内シグナル伝達経路のいずれの段階で作用するものであっても、結果的にアデニル酸シクラーゼの活性を抑制するものであればよい。従って、例えば、アデニル酸シクラーゼの活性抑制に至る細胞外シグナルを受容体に与える物質や、アデニル酸シクラーゼを直接阻害する物質が使用でき、受容体とアデニル酸シクラーゼとの間のシグナル伝達を媒介する分子に作用する物質も使用できる。

【0021】

ある物質がアデニル酸シクラーゼの活性を抑制するか否かを調べるためには、増殖または樹立させようとする細胞（例えばES細胞）の培養培地に当該物質を添加し、cAMP生成の抑制度合いを観察すればよい。

【0022】

アデニル酸シクラーゼを直接阻害する物質の例には、SQ22536（9-（テトラヒドロ-2-フラニル）-アデニン）、2',5'-ジデオキシアデノシン、9-シクロペンチルアデニン、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-ジホスフェート、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-モノホスフェート、MDL-12,330A（シス-N-（2-フェニルシクロペンチル）アザシクロトリデセー

1-エン-2-アミン)などの化合物が挙げられ、これらはCALBIOCHEM-NOVABI OCHEM CORPORATION (California, USA)などから市販されており、容易に入手できる。これら物質の使用量は、その種類に応じて適宜に決定されてよい。例えば、SQ22536を使用する場合、その培地中の最終濃度は特に限定されるものではないが、普通、 $1\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ 、好ましくは $10\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ の最終濃度となるような量で使用する。

【0023】

多能性幹細胞においてアデニル酸シクラーゼの活性を抑制する物質の他の例としては、次ぎのようなペプチドを挙げることができる：副腎皮質刺激ホルモン (corticotropin, adrenocorticotropic hormone: ACTH)、脳ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP)、下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: PACAP) など。

【0024】

また、それらペプチドと実質的に同様の生理活性を有するペプチド、すなわち上記ACTH、BNP、PACAPなどのペプチドを構成するアミノ酸配列について一つ又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加しており、対応する完全長ペプチドと同様の生理活性を有するものも使用することができる。例えば、ACTHは、39個のアミノ酸から成るペプチド (ACTH (1-39)) であって、N末端1-24のアミノ酸は各動物に共通し、25-33のアミノ酸は種によって相違し、N末端1-18に副腎皮質刺激作用があることが知られているが、本発明においては、ACTH (1-39) に加え、その断片であるACTH (1-24)、ACTH (11-24) など也可以使用することができる。これらのペプチドは、普通、 $1\text{nM}\sim 100\mu\text{M}$ 、好ましくは $1\sim 10\mu\text{M}$ の最終濃度となるような量で使用する。

【0025】

上記したACTH、BNP、PACAPなど並びにそれらのフラグメント自体はいずれも文献に記載されているか (例えば、米国特許公報第4,415,546号; 今堀和友ら: 生化学辞典 (第3版) 1178-1179頁、721頁及び

286～287頁(1998)(株)東京化学同人)、又は試薬として市販されているか、若しくは文献記載の方法に準じて製造することが可能なものである。例えば、それらペプチドは、所望のアミノ酸配列を構築するための当業者にとって周知の合成法で作成することができる。また、それらペプチドをコードする遺伝子は大腸菌などの宿主細胞に導入し、ペプチドを発現させ、これを単離、精製する遺伝子操作により製造することもできる。

【0026】

本発明の培地補充物は、単一のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を含んでもよく、複数のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質をいかなる組合せで含んでもよい。従って、複数の化合物を含む培地補充物、複数のペプチドを含む培地補充物、及び化合物とペプチドの両方を含む培地補充物などを使用できる。

【0027】

本発明により、上記培地補充物を添加した多能性幹細胞培養用の培養培地が提供される。当該培地補充物は、支持細胞や血清に由来する液性因子の代替物であるから、培養培地に支持細胞や血清が存在しても多能性幹細胞の培養に支障をきたすものではないが、支持細胞や血清が存在すれば、それらに由来する病原体による汚染や、異種移植として特別の制限を回避することができない。従って、好ましくは、培養培地として支持細胞及び／又は血清を含まないものが使用され、より好ましくは、培養培地として支持細胞も血清も含まないものが使用される。

【0028】

すなわち、本発明の培養培地は、好ましくは細胞培養用最小培地 (cell culture minimum medium: CCMM) を基礎培地とし、これに分化抑制因子、血清置換物、抗酸化剤 (例えば、2-メルカプトエタノール (2-ME)、ジチオトレイトール、アスコルビン酸) 及び上記した本発明の培地補充物 (すなわち、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質) を含有させたものであって、支持細胞や血清を含有しないものである。それら CCMM、分化抑制因子、血清置換物、抗酸化剤及び本発明の培地補充物は、以下に説明するように、いずれも人為的に調製することの可能な、既知物質であるから、それらによって構成される本発明の培養培地は、生体成分の使用に起因する未知病原体による汚染を回避することができる。

ものである。

【0029】

基礎培地として使用する「細胞培養用最小培地 (CCMM)」は、これに分化抑制因子、血清置換物、抗酸化剤及び本発明の培地補充物を含有させた場合、多能性幹細胞の未分化増殖を可能にする任意の培地を意味する。

【0030】

CCMMには、通常、標準無機塩（亜鉛、鉄、マグネシウム、カルシウム、カリウムなど）、ビタミン、グルコース、緩衝系、必須アミノ酸などを添加する。その具体例としては、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimal essential Medium (MEM), Basal Medium Eagle (BME), RPMI1640, F-10, F-12, α Minimal essential Medium (α MEM), Glasgow's Minimal essential Medium (GMEM), Iscove's Modified Dulbecco's Mediumなどを挙げることができ、市販のものが使用されてもよい。

【0031】

最も好ましいCCMMは、表1の組成のGMEMである。

【表1】

成分	濃度 (mg/L)
CaCl ₂ (無水)	200.00
Fe (NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0.10
KCl	400.00
MgSO ₄ (無水)	97.67
NaCl	6400.00
NaHCO ₃	2750.00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	107.80
D-グルコース	4500.00
フェノールレッド	16.00
L-アルギニン · HCl	42.00
L-システイン · HCl	31.29

(表 1 の続き)

【表 2】

L-グルタミン	292.00
L-ヒスチジンHCl・H ₂ O	21.00
L-イソロイシン	52.40
L-ロイシン	52.40
L-リジン・HCl	73.10
L-メチオニン	15.00
L-フェニルアラニン	33.00
L-スレオニン	47.60
L-トリプトファン	8.00
L-チロシン・2Na・2H ₂ O	52.19
L-バリン	46.80
D-Caパントテン酸	2.00
塩化コリン	2.00
葉酸	2.00
i-イノシトール	3.60
ニアシンアミド	2.00
ピリドキサールHCl	2.00
リボフラビン	0.20
チアミンHCl	2.00

【0032】

好ましくは、CCMMには、0.1mM非必須アミノ酸および1mM ピルビン酸ナトリウムを加える。非必須アミノ酸はL-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-プロリン、L-セリンの混合物で、例えば MEM non-essential amino acids solution 10 mM liquid (Invitrogen) として市販されているものを使用する。ピルビン酸ナトリウムは、例えば MEM Sodium pyruvate solution 100 mM liquid (Invitrogen) として市販

されているものを使用する。

【0033】

分化抑制因子は、支持細胞および多能性幹細胞自身が放出する液性因子であり、未分化細胞の分化を抑制する。代表的な分化抑制因子としては、白血病阻害因子 (LIF) が挙げられる。分化抑制因子は、元来、生体に存在する物質であるから、生体からの採取も不可能ではないが、病原体の汚染を避けるためにも、又、経済的にも、人為的に合成されるものを使用するのが好ましい。例えば、LIF のようなタンパク質性の分化抑制因子の場合、遺伝子操作によって製造される組換え分化抑制因子タンパク質を使用するのが好ましい。

【0034】

抗酸化剤としては、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、アスコルビン酸などが使用可能であるが、通常は2-メルカプトエタノールを使用する。これらの物質は市販されており、容易に入手できる。

【0035】

血清置換物は、これを無血清培養培地に添加することにより、多能性幹細胞の増殖を支持し得る物質を意味する。血清置換物は、単一物質であっても、混合物であってもよく、具体的にはアルブミン (例えば、ウシ血清アルブミン) またはアルブミン置換物 (例えば、ウシ下垂体抽出物、コメ加水分解物、ウシ胎児アルブミン、卵アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウシ胚抽出物、AlbuMAX I (登録商標))、アミノ酸 (例えば、グリシン、L-アラニン、L-アスパラギン、L-システイン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェアラニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン)、ビタミン、トランスフェリンまたはトランスフェリン置換物 (例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸、エチレングリコールビス (β -アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-テトラ酢酸、デフェロキサミンメシレート、ジメルカプトプロパノール、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、トランス-1,2-ジアミノシクロヘキサン-N,N,N',N'-テトラ酢酸のような鉄キレート物、クエン

酸第2鉄キレート物、硫酸第1鉄キレート物などの鉄キレート化合物)、抗酸化剤(例えば、還元型グルタチオン、アスコルビン酸-2-リン酸塩)、インスリンまたはインスリン置換物(例えば、塩化亜鉛、硝酸亜鉛、臭化亜鉛、硫酸亜鉛などの亜鉛含有化合物)、コラーゲン前駆体(例えば、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、アスコルビン酸)及び微量元素(例えば、 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br^- 、 I^- 、 Mn^{2+} 、 F^- 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、 Zr^{4+})から選択される1種又はそれ以上の成分を含有するものである。

【0036】

なお、血清置換物の一例は、特表2001-508302号公報に「無血清真核生物細胞培養培地補充物」として詳記されており、当該公報の記載を参酌して血清置換物の組成を適宜に決定すればよい。代表的な血清置換物は、胚性幹細胞血清置換(KSR)として Invitrogen 社から販売されており、容易に入手可能である。

【0037】

上記LIF、2-ME及びKSRは、培養培地中において、それぞれ通常、 $1\sim 10000\text{ unit/ml}$ 、 $1\sim 1000\mu\text{M}$ 、及び $0.5\sim 90\%$ (v/v)の最終濃度、好ましくは $100\sim 1000\text{ unit/ml}$ 、 $10\sim 100\mu\text{M}$ 、及び $5\sim 20\%$ の最終濃度となるような量で使用する。本発明の培地補充物およびこれらの各添加成分は、培地に対して最初から目的の最終濃度となるような量で添加されてもよく、2回又はそれ以上の回数に分けて添加し、最終的に目的の濃度となるような量で使用されてもよい。培養培地は、通常、pHを重炭酸塩により $7.0\sim 8.2$ 、好ましくは $7.3\sim 7.9$ に調節して使用される。

【0038】

本発明の培地補充物及び培養培地は、それぞれ溶液形態又は乾燥形態に調製されてよい。溶液形態の場合、濃縮組成物(例えば $1\times\sim 1000\times$)として提供されてもよく、使用に際して、適宜に希釈されてもよい。溶液形態又は乾燥形態の培地補充物または培養培地を希釈または溶解するのに使用する液体の種類は、水、緩衝水溶液、生理食塩水溶液などがあり、必要に応じて容易に選択され得る。

【0039】

好ましくは、本発明の培地補充物または培養培地を滅菌して、コンタミネーションを防止する。滅菌方法には、紫外線照射、加熱滅菌、放射線照射および濾過などがある。

【0040】

本発明により、多能性幹細胞を培養して、分化能を保持したまま、未分化増殖を行うには、上記した本発明の培養培地、好ましくは細胞培養用最小培地に白血病阻害因子、抗酸化剤、血清置換物及び本発明培地補充物を含有させてなる培地を使用して、多能性幹細胞を、この分野で採用されている通常の培養条件下で培養すればよい。

【0041】

多能性幹細胞は、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ウシ、ブタ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、ヒツジを含む哺乳類、鳥類、爬虫類などの多様な動物に由来するものを使用し得るが、通常は、哺乳類に由来するものである。多能性幹細胞の具体例としては、ES細胞、EG細胞、EC細胞、APS細胞、MAP細胞などを挙げることができる。繁用される典型例は、マウスのES細胞である。培養する多能性幹細胞の数に特に限定はないが、本発明の培養方法は、特に1個の多能性幹細胞を培養して増殖させ、クローン細胞集団を形成させることを可能にする点で有利である。

【0042】

培養すべき多能性幹細胞は、それ自体、支持細胞依存性のものでもよいが、支持細胞非依存性であるものが好ましい。支持細胞依存性多能性幹細胞を支持細胞非依存性にするには、次のように処理すればよい。すなわち、支持細胞を使用しない培養条件で、数次にわたる継代操作を行い、このような条件に適合した細胞を選択する。

【0043】

本発明による多能性幹細胞の培養方法における具体的な操作は、培養条件を含め、当該技術分野で常套の操作及び条件に従って、これを行うことができる。例

例えば、中辻憲夫編：実験医学別冊・ポストゲノム時代の実験講座4「幹細胞・クローン研究プロトコル」、羊土社（2001年）、Hogan, G. ら編：マウス胚の操作：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY(1994)、Robertson, E. J. 編：奇形ガンおよび胚性幹細胞、A Practical Approach, IRL Press Oxford, UK (1987) などの記載を参酌して適宜に決定することができる。

【0044】

代表的な継代操作と培養条件を挙げれば、以下のとおりである。すなわち、ES細胞を継代するには、まず成育したES細胞のコロニーをリン酸緩衝化生理食塩水（phosphate buffered saline：PBS）で1～2回リンスし、その後十分量のトリプシン-EDTA溶液（0.25%トリプシン-1mMEDTA、PBS中）を細胞層を覆うように添加して5分間放置する。その後、トリプシン阻害剤を含むPBSまたは血清を含むES細胞培養用基礎培養液（CCMM+LIF+2-ME）を添加し、ピペティングにより細胞塊を分離する。この細胞懸濁液から、通常遠心分離により細胞を沈殿させる。上清を除去後、沈殿した細胞を血清または血清置換物を含むES細胞培養用基礎培養液に再懸濁し、この一部を支持細胞層またはゼラチン化したプラスチックプレート内に播種し、37℃、5%CO₂下で培養する。

【0045】

本発明方法の一つの実施態様として、0.1%（w/v）ゼラチン溶液で処理してゼラチン化したプラスチックプレート内に37℃に温めた本発明の培養培地を入れ、そこにプレート面積1cm²当たり10～1000個の多能性幹細胞を播く。プレートをCO₂インキュベーター内に置き、37℃、5%CO₂下で培養する。コロニーが成育したら（例えば、E14tg2a細胞では7日以内）、新しい培地に播き直し、継代する。継代に際しては、トリプシン阻害剤を含むPBSを使用することが望ましい。

【0046】

「支持細胞及び／又は血清が存在せず、かつ、本発明の培地補充物が存在しない条件下では未分化増殖を起こさない播種条件」とは、近接する多能性幹細胞同

士の相互作用により当該多能性幹細胞の未分化増殖が誘導されるよりも低密度な播種条件を指す。より具体的には、細胞 1 個/mm² 以下の播種条件などが好適なものとして例示される。均一な多能性幹細胞系統の樹立や、遺伝子操作を行った多能性幹細胞の増殖に際し、1 つの多能性幹細胞からそのクローン細胞集団を得る工程などは、勿論この条件に該当する。

【0047】

本発明の好ましい実施態様においては支持細胞や血清が使用されないから、通常の培養方法で行われる血清のロットのスクリーニング、支持細胞の選択および培養を省くことができる。また、本発明による既知成分のみから構成される培養培地を使用した場合、ゼラチンコートプレート上で低密度播種条件下に単一の支持細胞非依存性多能性細胞を未分化状態で増殖させることが可能である。

【0048】

なお、本発明は、支持細胞と血清を使用しない細胞培養培地に添加することにより、多能性幹細胞の未分化増殖を可能ならしめるような物質のスクリーニング方法を提供するものでもある。すなわち、細胞培養用最小培地に白血病阻害因子、血清置換物、抗酸化剤及び候補物質を添加してなる培養培地を使用して、支持細胞非依存性の多能性幹細胞（例えばマウスの ES 細胞）を培養し、当該多能性幹細胞の未分化コロニーの生成の有無を確認し、顕著な陽性を示すものを本発明により培地補充物として選択するものである。

【0049】

未分化コロニーの形成は、例えばライシュマン (Leishman) 染色を含むタンパク質染色を使用して形態的に確認できる。また、アルカリフォスファターゼ、SSEA-1、3、4 抗原などの未分化細胞マーカーの存在を抗体で確認することも可能である。さらに、Oct-3/4 遺伝子や Rex-1 遺伝子の発現も、未分化細胞に特徴的であるから、確認手段として採用されてもよい。通常は、これらの方法を複数組合せて未分化であることを確認する。

【0050】

上記スクリーニング法を実施する場合の標準培養培地の組成と培養条件は次のとおりである：

標準培養培地の組成:

GMEM、10% KSR、 $10\mu\text{M}$ 2-ME、 1000U/ml LIF、
0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム

培地に播種する多能性幹細胞の数:

培養面積 1 cm^2 当り培養液 1 ml を使用し、100個を播種する。

培養条件: 37°C 、5% CO_2

確認及び観察手段:

7日後に培地を観察し、多能性幹細胞の未分化コロニーの数 ($/1\text{ cm}^2$) に
より、次のとおり判定する:

【表 3】

未分化コロニーの数 ($/\text{cm}^2$)	判定
0	-
1 ~ 5	+ 1
6 ~ 10	+ 2
10 以上	+ 3

【0051】

本発明の培養方法によって、1個の多能性幹細胞を培養して増殖させ、クローン細胞集団を形成させることができる。このことは、ゲノムを改変した多能性細胞の集団が必要な場合、例えばトランスジェニック動物を作成する場合に、有利である。

【0052】

多能性幹細胞の代表例であるES細胞を培養するための培地としては、従来、細胞培養用最小培地に、(1) 白血病阻害因子、(2) 血清、(3) 2-メルカプトエタノール、(4) 支持細胞を添加したものが使用されてきた。ただし、(1) ~ (3) が含有されている場合には、(4) の存在は必須ではなく、ゼラチンでコートしたプレート上に支持細胞非依存性ES細胞を直接付着させて培養することも可能である。また、(4) の存在を前提とした場合、(2) を(5) 血清置換物で置換することができ、血清自体を使用しないES細胞の培養が可能と

なる。本発明は、このような血清が使用されない培地に対し、さらに（６）アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を添加することにより、（４）支持細胞の不存在下にES細胞を培養することを可能ならしめた。

【0053】

以下の実施例は、そのような血清も支持培地も使用しない、すべて既知成分で調製された培地により、ES細胞を培養することが可能であることを証明するものである。

【0054】

【実施例】

実施例 1

細胞培養最小培地として、グラスゴウ最少必須培地（Glasgow minimum essential medium: GMEM; Sigma 社）を使用し、これに（１） 1×10^3 U/ml LIF (ESGRO, Invitrogen 社)、（３） $0.1 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール（ナカライテスク社）、（５）10% (v/v) KSR (Invitrogen 社) を添加した培養液 1 ml で、100 個の支持細胞非依存性ES細胞 (E14tg2a (Hooper, M. et al., Nature, 325, 292 (1987))、CGR8 (Mountford, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4303 (1994)) 及びそれから派生したES細胞) を、0.1% (w/v) ゼラチン溶液で処理して、ゼラチン化した12ウェルプレートの1ウェル内で、37℃、5% CO₂ 下で培養した。

【0055】

培養5日目以降に、培養液を吸引除去後、プレート面を覆う量のライシュマン (Leischman) 染色液 (1.5 g Leischman Staining: Sigma 社 / Lメタノール) を加え、室温で10分間保持し、水洗した (ライシュマン染色)。青染したコロニーを肉眼または光学顕微鏡で観察した結果、形態的に未分化状態を維持したコロニーの形成は、全く認められなかった (図1 (g))。この組成の培養液に、さらに（２）0.3% (v/v) FCS を添加して培養すると、平均17個の未分化コロニー形成が認められた (図1 (d))。このことから、（１）+（３）+（５）の組成では、（２）FCS に含まれる未分化コロニー形成に必要な成分が欠如していると考えられた。また、同じ培養液組成 ((1) + (3) + (5

)) で、ウェル当り 1000 個以上の ES 細胞を培養すると、未分化コロニーの形成が認められた。この高密度培養上清 (conditioned medium: CM) を最終濃度 10% (v/v) で培養液に添加して、ウェル当り 100 個の ES 細胞を培養すると、平均 7 個の未分化コロニーの形成が認められた (図 1 (f))。このことは、ES 細胞自身が未分化コロニー形成に必須な成分を分泌していることを示す。

【0056】

そこで、種々の既知成長因子、サイトカイン、ペプチドホルモンなどから選択された候補ペプチドを (1) + (3) + (5) を含む培地に添加し、ES 細胞を 37℃、5% CO₂ 下で培養して、その未分化コロニー形成能を観察した。その結果、1 μM 副腎皮質刺激ホルモン、1 μM 脳ナトリウム利尿ペプチド及び 1 μM 下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドを添加した培地において、形態的に明らかな ES 細胞の未分化コロニーの形成が認められた (図 1 (e) ; ペプチドとして ACTH を使用)。なお、図 1 (a) ~ (c) は、GMEM と LIF と 2-ME からなる培地にそれぞれ FCS + 支持細胞、KSR + 支持細胞および FCS を添加した場合を示す。

【0057】

これらのペプチドホルモンの補充によって未分化コロニーを形成した ES 細胞では、未分化状態のマーカであるアルカリフォスファターゼ活性染色試験で陽性であり (図 1)、未分化細胞特異的に発現する転写因子 Oct-3/4 の発現も、相同遺伝子組換え法で導入したレポーター遺伝子の活性により確認された。従って、これらのペプチドは、FCS や CM のように未分化コロニー形成支持能を有するものと理解される。

【0058】

実施例 2

上記実施例 1 において、試験した候補ペプチドのうちで最も低濃度で活性を示した ACTH 及びそのフラグメントを用いて、その有意性を検討した。上記同様、細胞培養最小培地に (1) LIF、(3) 2-ME 及び (5) KSR を添加した培養培地に、ACTH 又はそのフラグメントを最終濃度 1 μM で添加したとき

、ACTH (1-39)、ACTH (1-24)、ACTH (11-24) は活性を示したが、ACTH (18-39) は活性を示さなかった。また、活性を示したもののうちではACTH (1-24) が最も強い活性を示し、最終濃度 $0.1 \mu\text{M}$ でも未分化コロニー形成を支持した。また、 $10 \mu\text{M}$ ACTH (1-24) を添加した条件での未分化コロニー形成率および細胞増殖速度は、0.3% FCSもしくは10% CM添加時と同等であった。

【0059】

以上の結果から、基礎培地としての細胞培養最小培地に、(1) LIF、(3) 2-ME、(5) KSR + (6) ACTH等のペプチドホルモンを添加したものは、血清や支持細胞がなくとも、多能性を維持した未分化状態でES細胞を増殖させることが可能であることが理解できる。

【0060】

実施例 3

ACTHが細胞内にどのようなシグナルを伝達する結果、血清や支持細胞の非存在下で多能性を維持した未分化状態でES細胞を増殖させるのかを解明するために、各種シグナル伝達阻害物質を培地に添加して、ES細胞の増殖を観察した。

【0061】

ACTHは、Gタンパク質共役受容体ファミリーに属するACTH受容体を活性化し、ACTH受容体は、 $G_{\alpha s}$ サブユニットを含む三量体Gタンパク質の活性化を介してアデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている。そこで、(1) $1 \times 10^3 \text{ U/ml}$ LIF、(3) $0.1 \mu\text{M}$ 2-ME、(5) 10% (v/v) KSR、及び(6) $10 \mu\text{M}$ ACTHを添加した細胞培養最小培地に、さらにアデニル酸シクラーゼ阻害剤である(7) SQ22536 (9-(テトラヒドロ-2-フランリ)-アデニン) (Sigma) $100 \mu\text{M}$ を添加し、その培地を使用して実施例1と同様にES細胞を培養した。その結果、予想に反して培養7日目の未分化コロニーの形成は全く阻害されず、むしろ個々のコロニーが顕著に大きくなった。

【0062】

SQ22536単独の効果を調べるために、(1) 1×10^3 U/ml LIF、(3) $0.1 \mu\text{M}$ 2-ME、(5) 10% (v/v) KSR、及び(7) SQ22536 $100 \mu\text{M}$ を添加した細胞培養最小培地を使用して、実施例1と同様にES細胞を培養した。その結果、ACTHを添加した場合と同様に、平均9個の未分化コロニーの形成が認められた。また、SQ22536の代りに、別のアデニル酸シクラーゼ阻害剤である2',5'-ジデオキシアデノシン (Sigma) $500 \mu\text{M}$ を添加した培地を使用しても、平均8個の未分化コロニーの形成が認められた。これらの結果から、アデニル酸シクラーゼ活性の抑制が、未分化コロニー形成を導くことが明らかになった。

【0063】

Gタンパク質共役型受容体によるアデニル酸シクラーゼの抑制は、通常、リガンド結合による $G_{\alpha i}$ サブユニットを含む三量体Gタンパク質の活性化を介して起こる。ACTHの効果がこのシグナル伝達経路を介するものであるか否かを確認するために、(1) 1×10^3 U/ml LIF、(3) $0.1 \mu\text{M}$ 2-ME、(5) 10% (v/v) KSR、及び(6) $10 \mu\text{M}$ ACTHを含む細胞培養最小培地に、 $G_{\alpha i}$ の阻害剤である百日咳毒素を最終濃度 100 ng/ml で添加し、その培地を使用して実施例1と同様にES細胞を培養した。その結果、ACTHの効果が抑制され、未分化コロニーの大きさが著しく減少した。このことは、ACTHの未分化コロニー形成支持効果が、 $G_{\alpha i}$ の活性化を介することを示す。また、ACTH受容体は $G_{\alpha s}$ と共役するので、ES細胞においてはACTHはその特異的受容体とは異なるGタンパク質共役型受容体と結合することが示唆される。

【0064】

以上の結果から、ACTHによる未分化コロニー形成支持作用は、以下のシグナル伝達経路を通じて起こることが判明した。① $G_{\alpha i}$ と共役するGタンパク質共役型受容体にACTHが結合し、② $G_{\alpha i}$ が活性化され、そして③アデニル酸シクラーゼの活性が抑制される。従って、血清及び支持細胞を含まない培地中でES細胞を未分化のまま増殖させるためには、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する方法であれば、どのような方法を採用してもよいことが理解できる。

【0065】

実施例 4

上記実施例 1 において、1 nM 副腎皮質刺激ホルモンを使用して培養して得られた未分化コロニー由来の ES 細胞を、さらに 2 回継代した後、これらをマウスの胚盤胞に注入し、偽妊娠雌マウス子宮に移植した。その結果、100 個の移植胚から 33 匹の産仔が得られ、30 匹が生後 3 週以降も生存していたが、これらのうち 17 匹は毛色上 70% 以上の ES 細胞寄与率を示す良好なキメラマウスであった。またこの 17 匹のうち 14 匹は雄であり、所謂 male distortion が確認され、それらの交配実験により、生殖細胞系列への ES 細胞の寄与が確認された。このことから、本培養条件が、ES 細胞の多能性を維持するのに十分であることが証明された。

【0066】

実施例 5

C57BL/6 純系マウスから受精後 3.5 日の胚盤胞期胚 30 個を採取し、これから免疫手術法によって単離した内部細胞塊を、それぞれ fibronectin でコートしたプレート内で、CCMM、(1) 1×10^3 U/ml LIF、(3) $0.1 \mu\text{M}$ 2-ME、 0.1 mM 非必須アミノ酸、 1 mM ピルビン酸ナトリウム、(5) 10% (v/v) KSR および (6) $10 \mu\text{M}$ ACTH からなる培養液で培養した。この結果、少なくとも 2 つの内部細胞塊は増殖を開始し、最終的に ES 細胞株として樹立されるに至った。これにより、この培養法が既に樹立された ES 細胞の培養のみならず、新たな ES 細胞株の樹立にも有用であることが証明された。

【0067】

以上、本発明は、「アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件」が、培地に対してアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を添加または配合する場合を例に挙げて説明されたが、そのような条件を他の適宜の方法で作りだすことも可能である。例えば、多能性幹細胞におけるアデニル酸シクラーゼ遺伝子の発現を抑制する方法（例えば mRNA や RNAi を使用）や、遺伝子操作でアデニル酸シクラーゼ活性を阻害する分子を発現させる方法（例えば拮抗型変異体を使用）が採用さ

れてもよい。

【0068】

【発明の効果】

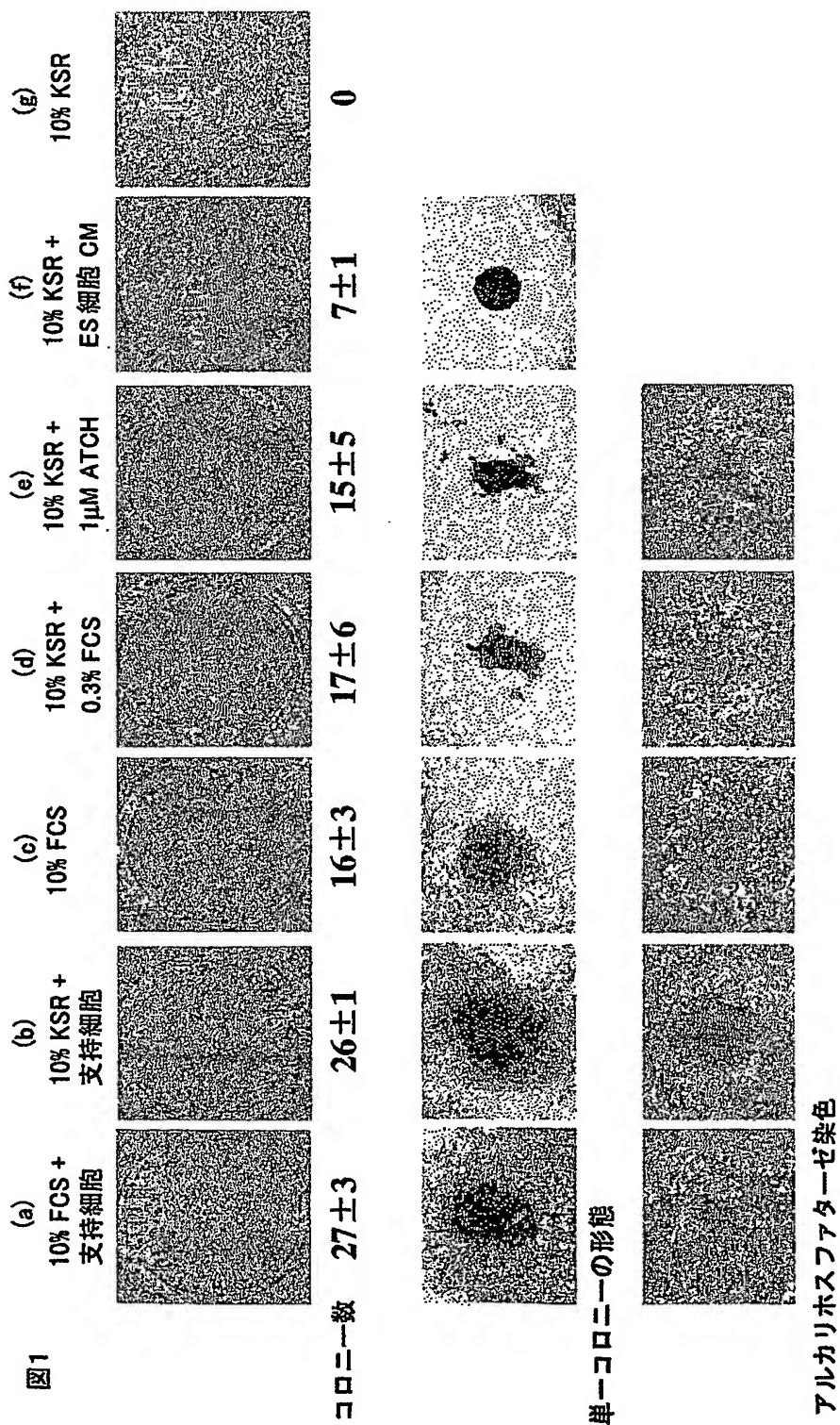
本発明により、多能性幹細胞を、血清や支持細胞を用いることなく、既知成分のみから構成される培地で培養し、多分化能を保持した未分化多能性幹細胞を増殖または樹立させることが可能になる。その結果、増殖または樹立した多能性幹細胞は、血清や支持細胞に由来する病原体によって汚染されることがなく、又、異種細胞との共培養に基づく特別の制限を回避できることとなる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 特定ペプチドの補充による血清及び支持細胞不存在下における未分化ES細胞の増殖を示す図（写真）である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 多能性幹細胞を、血清や支持細胞を用いることのない培地で培養し、分化能を保持した未分化多能性幹細胞を増殖または樹立させること。

【解決手段】 多能性幹細胞を培養する培地を、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を補充した、既知成分のみから構成する。

【選択図】 図 1

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 185124

【提出日】 平成15年 1月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-318052

【承継人】

【識別番号】 502396775

【住所又は居所】 奈良県高市郡明日香村細川 6 8 9

【氏名又は名称】 丹羽 仁史

【承継人代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【承継人代理人】

【識別番号】 100086405

【弁理士】

【氏名又は名称】 河宮 治

【承継人代理人】

【識別番号】 100064610

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 正二

【承継人代理人】

【識別番号】 100067035

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩崎 光隆

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 4,200円

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-318052
受付番号	50300139876
書類名	出願人名義変更届
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成15年 3月14日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】 502396775

【住所又は居所】 奈良県高市郡明日香村細川 689

【氏名又は名称】 丹羽 仁史

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100062144

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見 1丁目3番7号 IMP
ビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】 青山 葆

【承継人代理人】

【識別番号】 100086405

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見 1丁目3番7号 IMP
ビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】 河宮 治

【承継人代理人】

【識別番号】 100064610

【住所又は居所】 大阪市中央区城見 1丁目3番7号 IMPビル
青山特許事務所

【氏名又は名称】 中嶋 正二

【承継人代理人】

【識別番号】 100067035

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見 1丁目3番7号 IMP
ビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】 岩崎 光隆

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【整理番号】 185124
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2002-318052
【承継人】
 【識別番号】 503359821
 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
 【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【承継人代理人】
 【識別番号】 100062144
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 青山 葆
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【選任した代理人】
 【識別番号】 100086405
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 河宮 治
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【選任した代理人】
 【識別番号】 100064610
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 中嶋 正二
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【選任した代理人】
 【識別番号】 100067035
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 岩崎 光隆
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-318052
受付番号	50301812681
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	笹川 友子 9482
作成日	平成 16 年 11 月 11 日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	503359821
【住所又は居所】	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
【氏名又は名称】	独立行政法人理化学研究所

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】	100062144
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】	100086405
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】	100064610
【住所又は居所】	大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMPビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	中嶋 正二

【選任した代理人】

【識別番号】	100067035
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	岩崎 光隆

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 185124
【提出日】 平成16年11月 2日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2002-318052
【補正をする者】
【識別番号】 503359821
【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【代理人】
【識別番号】 100062144
【弁理士】
【氏名又は名称】 青山 葆
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【発送番号】 109043
【手続補正1】
【補正対象書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【補正対象項目名】 提出物件の目録
【補正方法】 追加
【補正の内容】
【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件
にかか一般承継による特許権の移転登録申請書で提出のものを
援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件
にかか一般承継による特許権の移転登録申請書で提出のものを
援用する。
【包括委任状番号】 0406388

特願 2002-318052

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏 名

理化学研究所

特願 2002-318052

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502396775]

1. 変更年月日

2002年10月31日

[変更理由]

新規登録

住 所

奈良県高市郡明日香村細川689

氏 名

丹羽 仁史

特願 2 0 0 2 - 3 1 8 0 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 2 3 9 6 7 9 7]

1. 変更年月日	2 0 0 2 年 1 0 月 3 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	兵庫県神戸市中央区雲井通 3 - 1 - 6
氏 名	小川 和也

特願 2 0 0 2 - 3 1 8 0 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 5 9 8 2 1]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
氏 名	独立行政法人理化学研究所